

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-330285

(43) 公開日 平成10年(1998)12月15日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/22	A D P	A 6 1 K 37/24	A D P
// C 0 7 K 14/50	Z N A	C 0 7 K 14/50	Z N A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 P 21/02	H
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	A
(C 1 2 P 21/02			

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-158080	(71) 出願人	000183370 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
(22) 出願日	平成9年(1997)5月30日	(72) 発明者	小北 季世子 大阪市此花区春日出中3-1-98 住友製 薬株式会社内
		(72) 発明者	橋本 学爾 大阪市此花区春日出中3-1-98 住友製 薬株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 中村 敏夫

(54) 【発明の名称】 血糖降下剤

(57) 【要約】

【課題】新規な血糖降下剤を提供する。

【解決手段】 F G F-10 を有効成分として含有する血糖降下剤、特に I I 型糖尿病における血糖降下剤を提供する。血糖降下剤の主流であるインスリンや経口血糖降下剤と異なり、緩徐かつ適度な血糖値コントロール作用を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】線維芽細胞増殖因子10 (FGF-10)、あるいはケラチノサイト増殖因子2 (KGF-2)を有効成分として含有する血糖降下剤。

【請求項2】配列番号：1のアミノ酸配列から成るポリペプチド、もしくはその付加、欠失、あるいは置換改変体である増殖因子を有効成分として含有する血糖降下剤。

【請求項3】増殖因子が大腸菌宿主が産生する組換えタンパクである請求項1または2の血糖降下剤。

【請求項4】糖尿病の治療に用いられる請求項1ないし3の血糖降下剤。

【請求項5】糖尿病がインシュリン非依存性糖尿病 (I型糖尿病、NIDDM)である請求項4の血糖降下剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は血糖降下剤、より詳しくは、線維芽細胞増殖因子10 (FGF-10)を有効成分として含有する糖尿病治療用の血糖降下剤に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、生活水準の向上により、欧米型の食生活への変化、あるいは運動不足傾向の増加に伴って、糖尿病および糖尿病性合併症の患者が増加している。

【0003】一般に糖尿病は、インスリン依存性 (I型、IDDM)とインスリン非依存性 (II型、NIDDM)とに分類され、糖尿病患者の90%以上は後者である。IDDMの治療にはインスリン注射が、NIDDMの治療には、運動療法や食事療法と共にスルホニル尿素やビグアナイド系の経口糖尿病治療薬が選択される [「今日の治療指針 TODAY'S THERAPY 1993」日野原重明、阿部正和監修、医学書院、494から498頁]。しかし、未だに糖尿病に対する根本的な薬物療法は確立されておらず、持続的な高血糖状態に起因する視力障害や末梢神経障害、創傷治癒の遅延・潰瘍化、肥満など種々の合併症を引き起こしているのが現状である。

【0004】一方、線維芽細胞増殖因子10 (FGF-10)は、京都大学の伊藤らのグループが初めて、組換え製法による発現および生理活性の確認を行った増殖因子である [特願平8-214378]。構造的にはFGFファミリーに属し、特にケラチノサイト増殖因子：KGF-1とも呼ばれている線維芽細胞増殖因子7 (FGF-7)と約60%のアミノ酸相同性を有する。また、ほぼ同時期に、グラバー (Gruber, J. R.) 他も、FGF-10と同じアミノ酸配列をコードする、KGF-2遺伝子を発見している [Wo 96/25422: Human Genome Science In

c.]。このFGF-10 (KGF-2)は、上皮細胞や骨細胞の増殖作用が確認されているものの、高血糖状態の生体の血糖値を下げる作用は未だ報告されていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、糖尿病患者の血糖値を安全にコントロールしうる、新規な血圧降下剤を提供することにある。特に、インシュリン非依存性であるII型糖尿病において有効な血圧降下剤を提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、種々の糖尿病モデル動物にて、末梢投与された神経栄養因子が与える影響を検討していたところ、II型の糖尿病のモデル動物の一種である高血糖自然発症マウス (ob/obマウス) [ハーバードおよびコールマン、メタボリズム、第26巻、59-99頁 (1977年) : Herberg, L., and D. L. Coleman. 1977. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. Metabolism 26:59-99.] に、FGF-10を投与することにより血糖値を低下させることを知った。この知見に基づき、更なる検討の結果、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、下記の医薬に関するものである。

(1) 線維芽細胞増殖因子10 (FGF-10)、あるいはケラチノサイト増殖因子2 (KGF-2)を有効成分として含有する血糖降下剤。

(2) 配列番号：1のアミノ酸配列から成るポリペプチド、もしくはその付加、欠失、あるいは置換改変体である増殖因子を有効成分として含有する血糖降下剤。

(3) 増殖因子が大腸菌宿主が産生する組換えタンパクである(1)または(2)の血糖降下剤。

(4) 糖尿病の治療に用いられる(1)ないし(3)の血糖降下剤。

(5) 糖尿病がインシュリン非依存性糖尿病 (II型糖尿病、NIDDM)である(4)の血糖降下剤。

【0008】以下、詳細に本発明を説明する。本明細書において、「線維芽細胞増殖因子10 (FGF-10)、あるいはケラチノサイト増殖因子2 (KGF-2)」とは、1996年に伊藤らによって発見されたFGFファミリーの細胞増殖因子 [特願平8-214378]で、配列番号：1のアミノ酸配列を有し、FRSK細胞 (上皮細胞系の培養細胞) などの増殖作用、ラット骨形成促進を有するタンパク質を意味する。以後の説明では、FGF-10の改変体、即ち、配列番号：1のアミノ酸配列から成るポリペプチドの付加、欠失、あるいは置換改変体をも含めて、「FGF-10」と総称する。代表的な改変体の作成方法や活性の測定法は、特願平8-214378号明細書に示されている。

【0009】なお、天然FGF-10は糖鎖を有するタ

ンパク質であるが、糖鎖の有無、種類に関わらず、同種の細胞増殖活性を有する限り、FGF-10という概念に含まれるものとする。また、FGF-10成熟タンパク質としては、(1)配列番号:1の40位ロイシン(Leu40)から始まり、208位セリン(Ser208)に終わる169アミノ酸のタンパク質、および、(2)69位セリン(Ser69)に始まり、208位セリン(Ser208)に終わる140アミノ酸のタンパク質、が現在判明しているが、上記のようにFGF-10はこの二種の成熟タンパク質に限定されるものではない。

【0010】「血糖降下剤」とは、病的な高血糖状態にある患者に投与し、血糖値を下げる医薬を意味する。「糖尿病」とは、通常100~120mg/dl程度にコントロールされている血糖値が異常に上昇する病気である。現在の診断基準では、血糖値が、グルコース75g負荷2時間後で200mg/dl以上、空腹時血糖が140mg/dl以上となっている。一般に糖尿病は、インシュリン産生細胞の減少を伴うインシュリン依存性(I型、IDDM)とインシュリン感受性の低下によって生じるとされるインシュリン非依存性(II型、NIDDM)とに分類され、糖尿病患者の90%以上は後者である。前者は、若年発症型で、自己免疫的にインシュリン産生細胞が破壊され、インシュリンの量が足りなくなるとされている。ケトosis傾向が強く、生命維持に継続的なインシュリン注射が必須とされている。「インシュリン非依存性糖尿病(II型糖尿病、NIDDM)」は、主に中年以降に発症するタイプの糖尿病で、インシュリンに対する体細胞の感受性鈍化が原因とされる。血中インシュリン濃度はむしろ高い。ケトosis傾向弱く、緩慢な進行のため、インシュリン注射より経口の血糖降下剤が常用されるが、高血糖が間接的に様々な合併症状を引き起こす。本発明、本明細書においては糖質コルチコイド等のステロイド剤を連投したときに生じる病的な高血糖状態(ステロイド糖尿病)、クッシング症候群(Cushing Syndrome)や末端肥大症に於ける高血糖状態も、正常ないしは高インシュリン状態での糖尿、という意味でII型糖尿病に含めるものとする。

【0011】(製造)本発明の血糖降下剤に用いるFGF-10は、固有の生理活性を示すものであれば、天然抽出品、遺伝子組換え品を問わず、精製して本発明に使用することができる。FGF-10の生産方法としては、(1)FGF-10産生組織からの抽出、(2)FGF-10産生細胞(初代培養細胞や株化細胞)の培養および抽出、(3)組換えDNAを導入した宿主細胞の培養および抽出などが考えられるが、一般的には、(3)組換えDNAを導入した宿主からの抽出が大量生産に適している。組換え技術によるFGF-10の製造方法を以下に簡単に記載するが、詳細は、特願平8-2

14378に記載されている。

【0012】(組換え工程)配列番号:2で示されるDNA配列を含むFGF-10のcDNAを発現ベクターに組み込む。ベクターとしては、適当な大腸菌、枯草菌、酵母、動物昆虫細胞等の宿主内で増殖できるプラスミドやファージが選ばれるが、例えば、大腸菌由来のpBR322、pBR325[ジーン(Gene)4巻121頁(1978)]、枯草菌由来pUB110[バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun.)112巻、678頁(1983)]、COS細胞に好適なpCDM8等が挙げられる。cDNAをプラスミドに組み込む方法としては、常法が、マニアティス(T. Maniatis)他、モレキュラー・クロニング(Molecular cloning)、コールドスプリングハーバーラボラトリー(Cold spring harbor lab.)239頁(1982)に記載されている。

【0013】(宿主)宿主は、ベクターの導入により形質転換され、FGF-10を産生できる生物や培養細胞であれば、特に限定されない。細菌としては、大腸菌、枯草菌(バチルス類)等、酵母としては、サッカロマイセス属、トルラ属、ヒキア属等、動物細胞としては、COS細胞、CHO細胞、NSO細胞等が代表例である。培養昆虫細胞、真菌、植物細胞、単細胞系だけでなく、目的蛋白質遺伝子を組み込まれた昆虫や哺乳類、植物も宿主の範疇に入る。

【0014】(活性測定)形質転換体から、公知の方法、例えば、コロニー・ハイブリダイゼーション法[ジーン(Gene)、10巻63頁(1980)]およびDNA塩基配列決定法[アロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)74巻560頁(1977)]を用い、所望のクローンを選出する。また、COS細胞にて一過性に発現させ、培養上清の生理活性を評価してクローン選択することも可能である。発現されたFGF-10蛋白の生理活性は、FRSK細胞などの上皮細胞の増殖促進作用を測定することにより評価できる。

【0015】(精製)組換え技術により生産されたFGF-10蛋白は、生化学の分野で常用される精製方法にて精製が可能である。イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相HPLC、硫酸沈澱、限外濾過、SDS-PAGEなどが適宜組み合わせられて用いられるが、FGF類の場合、特にヘパリン等のリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィー、抗体カラムクロマトグラフィーなどが大量精製に好適である。FGF-10蛋白に対する抗体は、ポリクローナル、モノクローナル共に、自体公知の方法で作製し得る。FGF-10特異的抗体は抗体カラムに使用出来るだけでなく、ELISA

等の免疫化学的定量法に使用できる。

【0016】(製剤)製剤としては、注射剤、経口剤、液剤、凍結乾燥品いずれも用いることができるが、特に皮下投与用注射剤が好ましい。これら非経口投与製剤には、当該分野にて公知の安定化剤、担体を用いることができ、使用時に等張溶液として用いるのが好ましい。医薬担体としては、例えば、アルブミン等の血漿由来蛋白、グリシン等のアミノ酸、マンニトール等の糖を用いることができ、通常、皮下あるいは筋肉内投与用凍結乾燥製剤に用いられる。また、水溶製剤、凍結乾燥製剤として使用する場合、凝集を防ぐためにTween 80などの界面活性剤を添加するのが好ましい。長期の薬効を要する場合は、公知のタンパク除放性製剤担体を用いて製剤する事もできる。

【0017】(使用方法)本発明の血糖降下剤は、主成分がFGF-10の場合は、通常成人キログラムあたり0.5 μ g~5mgを静脈内、皮下、または筋肉内投与する。投与回数は投与量、投与経路や患者の症状により適宜増減されるものであるが、月一回から一日三回の投与が可能であり、一般的には週1から5回、数週間の投薬治療が行われる。この治療により、血糖値はゆっくりと減少し、従来の血圧降下剤にない適度な血糖値の低下と安定が得られる。FGF-10による血糖降下作用は、従来の知見から説明できるものではないが、少なくとも、インシュリンあるいはIGFの作用とは全く異なる、新しい薬理機序を介したものであると考えられる。

【0018】(毒性)正常マウス(C57BL/6N、雄性、5週齢：日本チャールスリバー社)に一週間、および肥満型糖尿病マウス(C57BL/6J-Lep^{ob}、雌性、6週齢：日本チャールスリバー社、Jackson laboratory)に二週間、最大5mg/kgのFGF-10を腹腔内、あるいは皮下投与したが、体重減少や死亡例はなかった。一般的に毒性は低いと考えられる。

【0019】

【発明の効果】本発明の血糖降下剤は、インスリンのように急激な低血糖を起こすことなく、緩徐に高血糖状態を改善する。

【0020】

【実施例】以下、本発明を実施例にて説明する。

(FGF-10の発現および精製)ヒトFGF-10の構造遺伝子に相当するDNA断片(配列番号：2)と、大腸菌発現ベクターであるpET11c(ストラタジーン社)をNdeIおよびBamHIで消化し、アガロースゲル電気泳動にて分取することにより直鎖化したベクターDNAをライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換することによりクローン化した。これらの中からFGF-10cDNAが正しい方向に挿入されたプラスミドを単離し、塩基配列の確認を行い、pET-hFGF-10を得た。これを用いて大腸菌BL21(DE

3)を形質転換した。得られた組換えクローンのうちの1つをBL21(DE3)/pET-hFGF-10と名づけ、これを用いてヒトFGF-10の発現生産を行った。

【0021】(培養)BL21(DE3)/pET-hFGF-10をアンピシリン100 μ g/mlを含むLB培地10mlに植菌したものを4本用意し、37℃で一晩前培養を行った。翌日それぞれ全量を100 μ g/mlを含むTB培地500ml \times 4本に植え込み37℃で振とう培養した。OD600=0.8に達した時点でIPTGを最終濃度が1mMになるように添加し、培養温度を28℃に下げてさらに6時間培養を継続した。

【0022】(抽出精製)培養液を遠心分離し、得られた菌体を50mMTris-HCl、pH8.0にて1回洗浄し、1mMEDTA、2 μ g/mlロイペプチン、2 μ g/mlペプスタチン、1mMPLISFを含む50mMTris-HCl、pH8.0に懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、ベックマンJ2-21M/E高速冷却遠心機にてJA-20ローターを用いて、15000回転で1時間遠心分離することにより上清を採取した。HiTrap Heparin(5ml、ファルマシア)を50mMTris-HCl、pH8.0で平衡化し、先に調製した菌体破碎上清をアプライした。続いて50mMTris-HCl、pH8.0で溶出液のA260がベースラインに戻るまで洗浄した後、連続的にNaCl濃度勾配を3Mまで増加させることにより、蛋白を溶出した。組換えヒトFGF-10に相当する約19kDaの蛋白は約1.2M NaClの位置に溶出された。なお、流速は2ml/分で行った。

【0023】(製剤例)本発明のFGF-10製剤のうち、代表的なものである皮下投与水溶/凍結乾燥製剤は、以下のように製造することができる。

(1)精製組換えFGF-10：1mgに対し、グリシン0.34mg、マンニトール9mg、非イオン性界面活性剤：ポリソルベート80、0.2mgを加え、燐酸緩衝液1ml(pH7.4、5mM)に溶解させ、上記溶液を凍結乾燥する。(2)150mM塩化ナトリウム、0.01%Tween 80を含有する10mMリン酸緩衝液(pH7.0)でFGF-10を5mg/mlになるように調製し、FGF-10水溶液を得る。

(3)150mM塩化ナトリウム、0.01%Tween 80を含有する10mMリン酸緩衝液(pH7.0)でFGF-10を5mg/mlになるように調製した。続いて、マンニトールを10mg/mlになるように添加し、FGF-10水溶液を得る。無菌的にバイアル充填し、常法に従って凍結乾燥して、FGF-10凍結乾燥製剤を得る。バイアル内に窒素を封入し、打栓する。

【0024】(薬理試験)一群10匹の肥満型糖尿病obese(ob/ob)マウス[C57BL/6J-Lep^{ob}、雌性、6週齢：日本チャールスリバー

社、Jackson laboratory]を自由摂食させ、1および5mg/kgのFGF-10を一日一回二週間投与した(皮下投与)。対照群(N=5)には生理食塩水を投与した。また、一群5匹の正常マウス[C57BL/6N、雄性、4週齢:日本チャールスリバー社]を自由摂食させ、1および5mg/kgのFGF-10を一日一回一週間投与した(腹腔内投与)。全

表1: ob/obマウスの血糖値

	血糖値(平均値±SD) (mg/dl)
対照群	453±17
FGF-10(1mg/kg)投与群	307±42**
FGF-10(5mg/kg)投与群	355±27**
	** : p<0.01

【0026】

表2: 正常マウスの血糖値

	血糖値(平均値±SD) (mg/dl)
対照群	215±17
FGF-10(1mg/kg)投与群	224±15
FGF-10(5mg/kg)投与群	209±32

【0027】表1に示すようにFGF-10を投与された糖尿病モデル群では、血中グルコース濃度が、対照群に比べて有意に減少したが、正常マウスの場合、血糖値は下がらなかった(表2)。低血糖を起こしやすいインスリンとは異なり、FGF-10では血糖値を正常域に調節する作用が期待される。

【0028】配列番号: 1

配列

Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser
 20 25 30
 Val Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu
 35 40 45
 Ala Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly
 50 55 60
 Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg
 65 70 75 80
 Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly
 85 90 95
 Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu
 100 105 110
 Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser
 115 120 125
 Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys
 130 135 140
 Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly
 145 150 155 160
 Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met
 165 170 175
 Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr

ての群において最後の投与の5時間後に腹部大動脈より採血し、血清を得た。血中グルコース濃度は、超微量多目的生化学自動分析装置CHEM1[ヘキソキナーゼ法、バイエル]を用いて測定した。

【0025】FGF-10を用いて得られた結果を表1および表2に示す。スチューデントt検定により、FGF-10投与群と対照群の血糖値の有意差を検定した。

配列の長さ: 208
 配列の型: アミノ酸
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: ペプチド
 起源
 生物名: ヒト

180 185 190
 Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser
 195 200 205
 【0029】配列番号：2
 配列の長さ：690bp
 配列の型：核酸
 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA
 起源
 生物名：ヒト

配列
 CTTCCAGTAT GTTCCTTCTG ATGAGACAAT TTCCAGTGCC GAGAGTTCCA GTACA ATG 58
 TGG AAA TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCC 106
 GGC TGC TGC TGC TGC TGC TTT TTG TTG CTG TTC TTG GTG TCT TCC GTC 154
 CCT GTC ACC TGC CAA GCC CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCA GAG GCC 202
 ACC AAC TCT TCT TCC TCC TCC TTC TCC TCT CCT TCC AGC GCG GGA AGG 250
 CAT GTG CGG AGC TAC AAT CAC CTT CAA GGA GAT GTC CGC TGG AGA AAG 298
 CTA TTC TCT TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT GAG AAG AAC GGG AAG 346
 GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAG AAC TGC CCG TAC AGC ATC CTG GAG ATA 394
 ACA TCA GTA GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA GCC ATT AAC AGC AAC 442
 TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC TAT GGC TCA AAA GAA 490
 TTT AAC AAT GAC TGT AAG CTG AAG GAG AGG ATA GAG GAA AAT GGA TAC 538
 AAT ACC TAT GCA TCA TTT AAC TGG CAG CAT AAT GGG AGG CAA ATG TAT 586
 GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCA AGG AGA GGA CAG AAA ACA CGA 634
 AGG AAA AAC ACC TCT GCT CAC TTT CTT CCA ATG GTG GTA CAC TCA TAGAG 684
 GAAGGC 690

【手続補正書】

【提出日】平成10年8月18日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】

【配列表】

配列

Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser
 20 25 30
 Val Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu
 35 40 45
 Ala Thr Asn Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly
 50 55 60
 Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg
 65 70 75 80

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

配列番号：1

配列の長さ：208

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト

【補正方法】変更

【補正内容】

Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly
 85 90 95
 Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu
 100 105 110
 Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser
 115 120 125
 Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys
 130 135 140 Glu Phe Asn Asn Asp Cys
 Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly
 145 150 155 160
 Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met
 165 170 175
 Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr
 180 185 190
 Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser
 195 200 205

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】配列番号：2

配列の長さ：690bp

配列

CTCCAGTAT GTTCCTCTG ATGAGACAAT TTCCAGTGCC GAGAGTTCCA GTACA ATG 58
 TGG AAA TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCC 106
 GGC TGC TGC TGC TGC TGC TTT TTG TTG CTG TTC TTG GTG TCT TCC GTC 154
 CCT GTC ACC TGC CAA GCC CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCA GAG GCC 202
 ACC AAC TCT TCT TCC TCC TCC TTC TCC TCT CCT TCC AGC GCG GGA AGG 250

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

CAT GTG CGG AGC TAC AAT CAC CTT CAA GGA GAT GTC CGC TGG AGA AAG 298
 CTA TTC TCT TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT GAG AAG AAC GGG AAG 346
 GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAG AAC TGC CCG TAC AGC ATC CTG GAG ATA 394
 ACA TCA GTA GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA GCC ATT AAC AGC AAC 442
 TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC TAT GGC TCA AAA GAA 490

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

TTT AAC AAT GAC TGT AAG CTG AAG GAG AGG ATA GAG GAA AAT GGA TAC 538
 AAT ACC TAT GCA TCA TTT AAC TGG CAG CAT AAT GGG AGG CAA ATG TAT 586
 GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCA AGG AGA GGA CAG AAA ACA CGA 634
 AGG AAA AAC ACC TCT GCT CAC TTT CTT CCA ATG GTG GTA CAC TCA TAGAG 684
 GAAGGC 690

(8)

特開平10-330285

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
C12R 1:19)

識別記号

F I